



DERWENT-ACC- 1994-077133  
NO:

DERWENT- 199410  
WEEK:

*COPYRIGHT 2008 DERWENT INFORMATION LTD*

TITLE: Oxidn. of alcohol(s) with immobilised microorganisms - uses microorganism immobilised on carrier in presence of nutrients

PATENT-ASSIGNEE: KANSAI PAINT CO LTD[KAPA]

PRIORITY-DATA: 1992JP-0186024 (June 19, 1992)

**PATENT-FAMILY:**

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP <u>06000090</u>	A January 11, 1994	N/A	007	C12P 007/26

**APPLICATION-DATA:**

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 06000090A	N/A	1992JP-0186024	June 19, 1992

INT-CL C12N011/02, C12N011/14, C12P007/26, C12P007/40, C12P007/26, C12R001:365, C12P007/26,  
(IPC): C12R001:01, C12P007/26, C12R001:06, C12P007/26, C12R001:40, C12P007/40, C12R001:365,  
C12P007/40, C12R001:01, C12P007/40, C12R001:06, C12P007/40, C12R001:40

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 06000090A

**BASIC-ABSTRACT:**

Oxidn. of alcohol cpds. (I) in substantially water insoluble or difficulty soluble organic solvent with an immobilised microorganism capable of oxidising prim. and/or sec. OH gps., immobilised on a carrier in the presence of nutrients for the microorganisms.

USE/ADVANTAGE - Low cost prodn. of aldehydes, ketones and carboxylic acids useful for various industries.

TITLE- OXIDATION ALCOHOL IMMOBILISE MICROORGANISM MICROORGANISM  
TERMS: IMMOBILISE CARRY PRESENCE NUTRIENT

DERWENT-CLASS: D16 E19

CPI-CODES: D05-H; E10-C02D2; E10-C04E; E10-D01C; E10-F02A1; E10-F02B;

CHEMICAL- Chemical Indexing M3 \*01\* Fragmentation Code G030 G050 G553 G563 H401 H481 J4 J451

**CODES:** J471 J472 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225  
M226 M231 M232 M233 M262 M280 M281 M311 M312 M320 M321 M332 M342 M381  
M382 M391 M415 M416 M510 M520 M530 M540 M541 M620 M720 M903 M904 N131  
N262 N343 Q232 Markush Compounds 199410-B7701-P

Chemical Indexing M3 \*02\* Fragmentation Code G030 G033 G563 J5 J561 J581 M210 M211  
M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231 M232  
M233 M240 M262 M280 M281 M282 M320 M415 M416 M510 M520 M530 M540 M541  
M620 M720 M903 M904 N131 N262 N343 Q232 Markush Compounds 199410-B7702-P

Chemical Indexing M3 \*03\* Fragmentation Code G030 G050 G553 G563 H401 H481 J0 J011  
J012 J1 J151 J171 J172 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M223  
M224 M225 M226 M231 M232 M233 M262 M280 M281 M311 M312 M315 M320 M321  
M331 M332 M342 M381 M382 M391 M415 M416 M510 M520 M530 M540 M541 M620  
M720 M903 M904 N131 N209 N224 N341 Q232 Markush Compounds 199410-B7703-P

**UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS:** ; 0245S ; 0270S ; 0866S ; 0950S ; 1300S ; 1680U

**SECONDARY-ACC-NO:**

**CPI Secondary Accession Numbers:** C1994-034984

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the oxidation approach of alcohols of using an immobilized microorganism.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, important carboxylic acids, aldehydes, and ketones are manufactured in large quantities on industry by the chemical oxidizing method of alcohols. By these approaches, acids, such as the heavy-metal catalyst and hydrogen peroxide like a potassium dichromate and potassium permanganate, a peroxide like organic peroxide, and a nitric acid, a platinum system catalyst, etc. have been used. However, it is also difficult for there to be many problems, such as advance of too much oxidation reaction, lack of site selectivity and stereoselectivity, and difficulty [ a reaction ] of accommodation, and to control advance of side reaction by these chemical oxidation styles.

[0003] Furthermore, in these chemical oxidation styles, there are many troubles, such as a problem of the environmental pollution by using a heavy-metal catalyst and an acid catalyst, a problem of the safety by using a peroxide catalyzer, and a problem of the catalyst cost by using a platinum system catalyst.

[0004] On the other hand, in order to conquer the fault of such a chemical oxidation style, the oxidation approach of alcohols of using the biocatalyst which has the advantages, such as energy-saving nature, high selectivity, and safety, is also tried widely [Hiromichi Ota, Society of Synthetic Organic Chemistry, Japan, 41 volumes, 1018(1983); Hiromichi Ota, Society of Synthetic Organic Chemistry, Japan, 46 volumes, and 726 (1989) reference].

[0005] However, the oxidation style of the alcohols using oxidizing enzyme escapes high cost-ization neither from the problem of an expensive catalyst, nor the problem of coenzyme demand nature. Moreover, the example which in the case of the method of oxidizing the alcohols using a microorganism extinction of the microorganism by toxicity, such as alcohols, carboxylic acids of an oxidation product, and ketones, or the fall of enzyme activity was not avoided, but was industrialized until now has been restricted to manufacture of matter with a very expensive part, such as production of the optically active substance with difficult manufacture, and manufacture of a position isomer.

[0006] Furthermore, when oxidation of the alcohols using a microorganism oxidized water-insoluble nature or poorly soluble alcohols, the problem that the churning force and aeration large in order to make the forcible distribution of this carry out underwater are indispensable, and a manufacturing cost costs dearly, and since raw material alcohols were in a suspension condition, it had the trouble that a reaction rate was low.

[0007] therefore, the fault of the above-mentioned chemical oxidation style -- conquering -- in addition -- and development of the biological oxidation approach of new alcohols with which the defect of the existing biological oxidation style is compensated is desired strongly.

[0008]

[Means for Solving the Problem] Then, this invention person sets to the oxidation approach of alcohols of using a microorganism. The toxic problem over microorganisms, such as alcohols of a substrate and carboxylic acids of an oxidation product, and ketones, is avoided. The result of having examined wholeheartedly the microorganism-oxidation approach of the alcohols which do not need troublesome actuation of underwater forcible distribution, aeration, etc., If the organic solvent which carries out inoculation of the microorganism to the hydrophilic immobilization support containing a nutrient and water, and does not discover toxicity to a microorganism to this is contacted A microorganism fungus body increases flourishing by the interface of an organic solvent and immobilization support, a fungus body phase is formed on support, and it came to complete a header and this invention for oxidizing the alcohols which this fungus body phase added in the organic solvent with a high reaction rate and yield.

[0009] In this way, if this invention is followed, adhesion immobilization of the microorganism which has the oxidation ability of the 1st class and/or the 2nd class hydroxyl group will be carried out, and hydrophilic immobilization support will be provided with the oxidation approach of the alcohols substantially characterized by the thing which contain alcohols under existence of the aqueous medium containing the nutrient of this microorganism, and which is made for an insoluble or poorly soluble organic solvent to contact the immobilized cell phase on this support at water.

[0010] One description of this invention is the interface of the organic solvent and the hydrophilic immobilization support which are represented by aliphatic hydrocarbon, and it is in the point that the fungus body phase which was made to increase a microorganism and was formed can be used as a catalyst, supplying the aqueous medium containing the nutrient of a microorganism. it becomes possible to make it by this oxidize by making this fungus body phase contact in the form where alcohols were substantially dissolved in the insoluble or poorly soluble organic solvent at water, consequently the long term stability of a high reaction rate and a catalyst is attained, and the power requirement for agitation and mixing is unnecessary as a matter of fact -- etc. -- an advantage is acquired. Moreover, although the body of the alcohols another description of whose of this invention is a substrate is carried out to a microorganism and they show strong toxicity to it, they can add this to an organic solvent by very high concentration, and are in the point that a fungus body phase can be contacted. For example, by n-octanol and n-decanol, a microorganism will become extinct only by only 0.5% existing by the emulsion system. However, if this invention is followed, it will be *Pseudomonas PUCHIDA* IFO, for example. In an organic solvent, about 12% or n-decanol, even if n-octanol is included 24%, it does not become extinct in it, but it increases, and 13696 forms a fungus body phase. Thus, according to this invention, possible [ contacting high-concentration alcohols to a microorganism fungus body phase ] consequently, a high reaction rate and high yield are obtained and alcohols can be oxidized by low cost.

[0011] Since an organic solvent [ still like aliphatic hydrocarbon ] of this invention whose description of another is generally has one about ten times [ several to ] the oxygen solubility of this compared with water, even if the point of it being few and ending has the aeration and churning for supplying the oxygen which oxidation of alcohols takes and they do not carry out aeration and churning depending on the case, it can be oxidized in alcohols with a high reaction rate and high yield.

[0012] Hereafter, this invention is further explained to a detail.

[0013] In addition, the organic solvent solution of the alcohols which are the organic solvent or substrate contacted to the above-mentioned immobilized cell phase may be hereafter called organic liquid phase.

[0014] If this can be supplied to the microorganism which there will be especially no constraint if usable immobilization support is the thing of a hydrophilic property in this invention, the water solution containing a nutrient is sunk in or contacted, and exists in an interface with an organic solvent No matter it may be what material, are usable. Specifically For example, an alginic acid, Synthetic macromolecules, such as naturally-occurring-polymers; polyvinyl alcohol, such as cellulose material like a carrageenan, a starch matrix, an agar, and a filter paper, urethane polymer, polyacrylamide, and polyacrylic acid; inorganic substances, such as foam glass and silica gel, etc. are mentioned.

[0015] There is especially no constraint in the configuration of the support for these immobilization, and it can be fabricated by the shape of fibrous and film, and the configuration of the arbitration of granular \*\*, and may be fabricated by the gestalt of cloth, a nonwoven fabric, paper, a board, etc.

[0016] On the other hand, the organic solvent in the organic liquid phase in contact with the above-mentioned immobilized cell phase, or the organic solvent for organic solvent solution preparation of the alcohols of a substrate What does not show toxicity substantially to an adhesion microorganism fungus body is desirable. Specifically Isoparaffins represented by the hydrocarbon of methane series of the carbon numbers 6-20 of a hexane, a heptane, an octane, a nonane, Decan, etc., such as normal paraffin or a liquid paraffin; isooctane; Pentyl benzene, Hexyl benzene, heptyl benzene, the carbon number of aliphatic series chains, such as octyl benzene, -- normal alkylbenzene [ of 5-15 ]; -- iso alkylbenzene [ , such as cumene, ]; -- alicyclic hydrocarbon [ , such as a cyclohexane, ]; -- ether, such as diethylether, etc. can be illustrated.

[0017] The microorganisms which have the oxidization ability of the 1st class used making adhere to the above-mentioned immobilization support, and making increase by the interface of support and an organic liquid and/or the 2nd class hydroxyl group may be which microorganisms, such as bacteria, mold, yeast, and actinomycetes. The microorganism which specifically belongs to the *Gluconobacter* (*Gluconobacter*) group, an *acetobacter* (*Acetobacter*) group, the *Pseudomonas* (*Pseudomonas*) group, the *Corynebacterium* (*Corynebacterium*) group, the *Alice* *ROBAKUTA* (*Arthrobacter*) group, a *Rhodococcus* (*Rhodococcus*) group, a *Nocardia* (*Nocardia*) group, the *Candida* (*Candida*) group, the *Hansenula* (*Hansenula*) group, an *Aspergillus* (*Aspergillus*) group, etc. is mentioned. Still more specifically *Gluconobacter ROZEUSU* (*Gl.roseus*), *Gluconobacter oxydans* (*Gl.oxydans*), *acetobacter Serratia liquefaciens* (*Ac.liquefaciens*), *Pseudomonas PUCHIDA* (*Ps.putida*), *Corynebacterium equi* (*Co.equi*), The *Alice*

ROBAKUTA simplex (Ar.simplex), Rhodococcus Rodney (Rh.rhodnii), Rhodococcus EKUI (Rh.equi), Nocardia FARUSHINIKI (No.farcinica), The Candida you tee squirrel (calcium.utilis), Hansenula ANOMARA (Ha.anomala), an ASUBERUKISU knee gar (As.niger), etc. can be mentioned.

[0018] The adhesion immobilization to the support of this microorganism for example, [ whether it applies or sprinkles to the support in which the aqueous medium which contains a nutrient for fungus body dispersion liquid beforehand was included, and ] Although the support can also be cultivated in the aqueous medium which contains a nutrient beforehand after making a microorganism fungus body adhere on support by the approach of supplying the aqueous medium which contains a nutrient in support after immersing support into fungus body culture medium or making a microorganism fungus body adhere to support by the suitable approach or [ usually, / that the alcohols as a substrate are included ] -- or it is appropriate to carry out by cultivating in the condition of having made the organic solvent which is not included contacting, proliferating the adhering microorganism fungus body by the interface of support and an organic solvent, and making an immobilized cell phase form on support. By this culture, a microorganism adheres to a carrier surface firmly and an immobilized cell phase hardly exfoliates from support.

[0019] The nutrient of the microorganism which can be used in the above-mentioned culture is easy to be the very general thing which can choose the optimal thing for the fungus body, for example, consists of sources of micronutrient, such as trace element salts, such as nitrogen sources, such as carbon sources, such as a glucose, and a urea, and magnesium sulfate, and a yeast extract, according to the class of use fungus body.

[0020] If support can fully carry out content maintenance of the culture medium like an agar, supply, the aqueous medium, i.e., the culture medium, containing the nutrient to an immobilized cell, can be performed by making it contain in support beforehand, and/or can also be performed by making microorganism immobilization support placed between the interfaces of the organic liquid phase which adds culture medium to for example, the above-mentioned organic liquid phase, and is formed, and a culture medium phase.

[0021] It is immersed into whether generally culture can be performed in culture apparatus, such as a thermostat and an incubator, or a substrate is included for support, and the organic solvent which is not included, and you may carry out, carrying out temperature control in the reaction container which added the aqueous medium which contains a nutrient further depending on the case. Culture conditions, such as culture temperature and culture time amount, can choose the optimal conditions according to the class of use microorganism.

[0022] Although what is necessary is just to carry out aeration of the oxygen which growth or oxidation reaction takes into an organic solvent, since the organic solvent has one about ten times [ several to ] the oxygen solubility of this as compared with water, generally it is not necessary to necessarily carry out aeration of it. Moreover, since the alcohols which are substrates dissolve and exist in an organic solvent, churning is unnecessary [ alcohols / intense churning like the emulsion method ] also about churning under culture, unnecessarily in many cases.

[0023] You may add from the early stages of the above-mentioned culture, or the alcohols which carry out a substrate may be added, after a microorganism fully propagates and forms an immobilized cell phase. Or you may add at the time of the arbitration from the early stages of culture to immobilized cell phase formation. As mentioned above, in order that alcohols may discover toxicity to a microorganism in many cases, results with higher generally, adding, after a fungus body phase fully grows are attained.

[0024] Alcohols can be made to oxidize by continuing culture in this way in the state of contact to the organic liquid phase which consists an immobilized cell phase of an organic solvent solution of the alcohols as a substrate on support.

[0025] It is not restricted to especially the alcohols with which the alcohol acid-ized reaction by this immobilized microorganism can be presented as a substrate, but various kinds of things can be used according to the alcohol acid-ized ability of an immobilized microorganism.

[0026] As alcohols which can be offered as a substrate, as the 1st class alcohol A methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol, isobutanol, N-amyl alcohol, isoamyl alcohol, n-octanol, Lower alcohol, such as n-decanol; Lauryl alcohol, myristyl alcohol, Higher alcohol, such as cetyl alcohol, stearyl alcohol, and oleyl alcohol; Ethylene glycol, Aliphatic series polyhydric alcohol, such as 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol, trimethylol propane, and pentaerythritol; aromatic alcohol, such as benzyl alcohol, etc. is mentioned. Moreover, as the 2nd class alcohol, alicyclic alcohol, such as aromatic alcohol [ , such as a fatty alcohol; benzhydrol, ], such as isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-octanol, 2, and 6-dimethyl-4-PEPUTA Norian, and a cyclohexanol, etc. is mentioned.

[0027] Especially the concentration of the alcohols in an organic solvent is not restricted, and can be decided according to the toxicity over a fungus body. Substantially, in water-insoluble nature thru/or a poorly soluble case, since these do not shift to an aqueous-phase, i.e., hydrophilic immobilization support, side, the alcohols with which especially oxidation reaction is presented can reduce the toxicity over the fungus body sharply. For example, in the case of n-octanol, with the Pseudomonas bacteria, such as Pseudomonas PUCHIDA (Ps.putida) and Pseudomonas FURAJI

(*Ps.fragi*), even 12% even of concentration in the organic liquid phase can be increased. Moreover, the Alice ROBAKUTA group bacteria, such as Alice ROBAKUTA duet deca DISU (*Ar.duodecadis*), In acetic bacteria, such as the *Bacillus* bacteria, such as *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis*), *Acetobacter aceti* (*Ac.aceti*), and *Gluconobacter oxydans* (*Gl.oxydans*), even 3% even of concentration in the organic liquid phase can be increased. Furthermore, in the case of toxic weak n-decanol, it bears with much yeast 24% or more with many bacteria at 6% or more of concentration.

[0028] On the other hand, the alcohols with which oxidation reaction is presented are water solubility, and according to the approach of this invention, the toxicity may be able to be eased even if strong toxicity is underwater shown to a microorganism. For example, although n-butanol has about 7% of solubility to water and only 0.2% of low concentration shows toxicity to a microorganism underwater The approach of this invention is followed in n-paraffin solution of this n-butanol. *Bacillus* (*Bacillus*) group bacteria and the Alice ROBAKUTA (*Arthrobacter*) group, Bacteria, such as the *Corynebacterium* (*Corynebacterium*) group and the *Microbacterium* (*Microbacterium*) group, Or when yeast, such as the *Saccharomyces* (*Saccharomyces*) group, is made to contact, butanol concentration can increase at least 3% or more.

[0029] According to the approach of this invention described above, oxidation reaction of the 1st class and/or the 2nd class alcohols, such as aliphatic series, aromatic series, and alicyclic, can be performed very efficiently using the growth fungus body of an immobilized microorganism. When side reaction may arise in that case, the metabolic deficiency stock which carried out breeding amelioration so that it might be intercepted by addition of a suitable metabolic turnover or a conversion inhibitor or such side reaction might not arise can be used.

[0030] According to the approach of this invention, most oxygen which oxidation reaction takes is supplied from an organic liquid phase side, and the alcohol acid ghost (aldehydes, ketones, and carboxylic acids) of a product is accumulated in the organic liquid phase. Therefore, by collecting the products accumulated in the organic liquid phase, and performing the approach of filling up the alcohols of a substrate, the contact frequency of an immobilized cell phase and a substrate can be made to increase by leaps and bounds, it becomes possible to raise a reaction rate, yield, and yield sharply, and continuation operation also becomes possible.

[0031] In this way, the fall of a production cost, energy saving of a process, laborsaving, etc. can acquire advantageous various advantages industrially by applying the approach of this invention to the production process of important, various aldehydes, ketones, and carboxylic acids on the industry in fields, such as heavy chemicals, drugs, cosmetics, perfume, a detergent, a surfactant, a fiber processing agent, fats and oils, a color, and a coating printing ingredient.

[0032]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention still more concretely, this invention is not limited to these examples. In addition, the section and % are weight criteria.

[0033] Example 1 poly peptone 1.0%, the agar plate which consists of 0.2% of yeast extracts, 0.1% of magnesium sulfate, and 1.5% of agars was prepared on the glass petri dish (surface area 38.5cm<sup>2</sup>), and 200micro of suspension I of the various microorganisms in Table 1 was \*\*\*\*(ed) using the KONRAJI rod. After cultivating at 30 degrees C on the 2nd and making [ desiccation and ] a fungus body phase form, 10ml multistory [ of the n hexadecane solution of a 10% 2-octanol ] was carried out, and stationary culture was carried out for seven days at 30 degrees C. After culture, the gas chromatography analyzed the solvent phase I of 1micro, and generated 2-octanone concentration was measured. The result is shown in Table 1.

[0034]

[Table 1]

表 1

供 試 微 生 物	2-オクタノン 生成濃度(g/ℓ)
ノカルディア・イタリカ JCM 03163	9.9
ノカルディア・ファルシニカ JCM 3002	10.7
ロドコッカス・エリトロポリス JCM 3201	6.3
ロドコッカス・ロードニー JCM 3203	8.1
ロドコッカス・エクイ JCM 6817	10.6
ロドコッカス・エクイ JCM 3730	20.7
アリスロバクター・シンプレックス JCM 1363	5.1
グルコノバクター・スポキシダンス IFO 3172	2.6
グルコノバクター・オキシダンス IFO 3189	2.1
グルコノバクター・グルコニクス IFO 3171	0.7
アセトバクター・リクエファシエンス IFO 12258	3.7
グルコノバクター・アセティ・ サブスペシース・アセチイ IFO 3281	1.7
アセトバクター・バステリアヌス・ サブスペシース・エスツネンシス IFO 13751	2.8
シュードモナス・ブチダ IFO 13696	5.5

[0035] It flowed into the glassware which can seal [ of 480ml of inner capacity ] 100ml of the same culture media as example 2 example 1, and the agar plate was prepared (surface area 43cm<sup>2</sup>). 100micro of various microorganism suspension I shown in Table 2 was \*\*\*\*(ed) using the KONRAJI rod to this, and it cultivated for two days at 30 degrees C. Then, multistory [ of the 10ml of the ethyl-caprylate solutions of a 10%2-octanol ] was carried out, and it cultivated at 30 degrees C for bottom two days of both-way shaking of 120rpm. After culture, the gas chromatography analyzed the culture phase I of 1micro, and generated 2-octanone concentration was measured. The result is shown in Table 2.

[0036]

[Table 2]



表 2

供 試 微 生 物	2-オクタノン 生成濃度(g/l)
グルコノバクター・オキシダンス IFO 3189	3.9
グルコノバクター・サボキシダンス IFO 3172	2.6
アセトバクター・アセチイ・ サブスぺーシース・アセチイ IFO 3281	2.9
アセトバクター・ハクエファシエンス IFO 12258	3.9
アセトバクター・アセトサス IFO 3129	3.7
アセトバクター・パステリアヌス・ サブスぺーシース・エスツネンシス IFO 13751	2.8
ロドコッカス・エクイ IFO 3730	20.4

[0037] It is Rhodococcus EKUI to the agar plate (surface area 43cm<sup>2</sup>) prepared like example 3 example 2. IFO 100micro of suspension I of 3730 was \*\*\*\*(ed), and it cultivated for two days at 30 degrees C. 10ml multistory [ of the n hexadecane solution of 2%2-methyl cyclohexanol ] was carried out to this, and it cultivated for four days under both-way shaking of 100rpm. Gas chromatography analyzed the culture phase I of 1micro after culture, and generation 2-methylcyclohexanone concentration was measured. Consequently, are recording of 2-methylcyclohexanone of 9.8 g/l was checked.

[0038] Example 4 Gluconobacter oxydans IFO 10g of calcium alginate beads was supplied in 200ml of one-day culture medium of 3189, it put for 5 minutes, and the microorganism fungus body was made to adhere to a bead front face. After pulling up a bead from culture medium after that and removing excessive moisture, it supplied to the glassware of 500ml of normal paraffin 150ml glass inner capacity which entered, it cultivated on the 1st, and the immobilized cell phase was made to form in a bead front face. Subsequently, the acrylic acid which is beta-oxidation system cutoff agent was added 0.005%, and it cultivated under the aeration of 0.2vvm, and churning of 20rpm on the 5th so that it might become 10% about n-decanol. In addition, the bead was condensed firmly and distributed to a solvent phase. Gas chromatography analyzed the culture phase I of 1micro after culture, and generation n-decanoic acid concentration was measured. Consequently, are recording of the n-decanoic acid of 9.5 g/l was checked.

[0039] The broken line of a HIDA chip box filter paper with example 5 surface area of 1600 degrees C (20x40cm<sup>2</sup>) is made into length, and it puts into a reaction vessel, and is the Candida you tee squirrel. IFO 200ml of one-day culture medium of 0396 was poured in, it was left for 5 minutes, and the fungus body was made to adhere to a filter paper. Next, except for culture medium, 20ml of culture media which do not contain a fungus body was put into the reaction bottom of the tank section, and 2-ethyl -1 and 3-hexandiol were added on level 10% in n-paraffin layer which is a solvent phase. Culture was performed for seven days under churning of 30 degree-C200rpm, and the aeration of 0.2vvm. Gas chromatography analyzed the solvent phase I after culture of 1micro, and the quantum of the generated 2-ethyl-3-hydroxy hexanoic acid was carried out. Consequently, the 2-ethyl-3-hydroxy hexanoic acid of 6.7 g/l was being accumulated in the solvent phase side.

[0040] Example of comparison 1 Rhodococcus EKUI IFO It will be poly peptone 1%, 0.2% of yeast extracts, 0.1% of magnesium sulfate, and Span-80 in 2ml of one-day culture medium of 3730. Inoculation was carried out to 20ml of culture media which consist of 0.01%, 2-octanol 82,164,246,328mg was added after one-day culture at 30 degrees C, and shaking culture was carried out by 120rpm for three days. It extracted 3 times by diethylether after culture, and generation 2-octanone concentration was measured with the gas chromatography after desiccation and dilution. Consequently, only 2-octanone of 0.1g / following was accumulating all.

[0041] Example of comparison 2 Rhodococcus EKUI IFO Inoculation of the 2ml of the one-day culture medium of 3730 was carried out to 20ml of the same culture media as the example 1 of a comparison, and it cultivated at 30 degrees C on the 1st. Then, 2-methyl cyclohexanol 94,187,281,374mg was added and it cultivated for 30 degrees C, and bottom three days of both-way shaking of 120rpm. It extracted 3 times by diethylether after culture, and generation 2-methylcyclohexanone concentration was measured with gas chromatography after desiccation and dilution.



Consequently, it was checked that only 2-methylcyclohexanone of 0.1 g/l is accumulating all.

---

[Translation done.]



(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90

(43)公開日 平成6年(1994)1月11日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/26		9282-4B		
C 1 2 N 11/14				
C 1 2 P 7/40		9282-4B		
// C 1 2 N 11/02				
(C 1 2 P 7/26				

審査請求 未請求 請求項の数1(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特開平4-186024

(22)出願日 平成4年(1992)6月19日

(71)出願人 000001409

関西ペイント株式会社

兵庫県尼崎市神崎町33番1号

(72)発明者 小田 忍

神奈川県平塚市東八幡4丁目17番1号 関

西ペイント株式会社内

(74)代理人 弁護士 小田島 平吉 (外2名)

(54)【発明の名称】 固定化微生物によるアルコール類の酸化方法

(57)【要約】

【目的】 アルコール類の酸化反応の触媒能を有する微生物の固定化増殖菌体を用いて、反応速度と収率の高い微生物的アルコール酸化方法を提供する。

【構成】 親水性固定化担体に1級及び／又は2級水酸基の酸化能を有する微生物を付着固定化し、該微生物の栄養源を含む水性媒体の存在下に、アルコール類を含む実質的に水に不溶性ないし難溶性の有機溶媒を該担体上の固定化菌体相と接触せしめることからなるアルコール類の酸化方法。

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90

(43)公開日 平成6年(1994)1月11日

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/26		9282-4B		
C 1 2 N 11/14				
C 1 2 P 7/40		9282-4B		
// C 1 2 N 11/02				
(C 1 2 P 7/26				

審査請求 未請求 請求項の数 1(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-186024

(22)出願日 平成4年(1992)6月19日

(71)出願人 000001409

関西ペイント株式会社

兵庫県尼崎市神崎町33番1号

(72)発明者 小田 忍

神奈川県平塚市東八幡4丁目17番1号 関

西ペイント株式会社内

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉 (外2名)

(54)【発明の名称】 固定化微生物によるアルコール類の酸化方法

(57)【要約】

【目的】 アルコール類の酸化反応の触媒能を有する微生物の固定化増殖菌体を用いて、反応速度と収率の高い微生物的アルコール酸化方法を提供する。

【構成】 親水性固定化担体に1級及び／又は2級水酸基の酸化能を有する微生物を付着固定化し、該微生物の栄養源を含む水性媒体の存在下に、アルコール類を含む実質的に水に不溶性ないし難溶性の有機溶媒を該担体上の固定化菌体相と接触せしめることからなるアルコール類の酸化方法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 親水性固定化担体に、1級及び／又は2級水酸基の酸化能を有する微生物を付着固定化し、該微生物の栄養源を含む水性媒体の存在下に、アルコール類を含む実質的に水に不溶性ないしは難溶性の有機溶媒を該担体上の固定化菌体相と接触せしめることを特徴とするアルコール類の酸化方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は固定化微生物を用いるアルコール類の酸化方法に関する。

【0002】

【従来の技術とその課題】従来より、アルコール類の化学的酸化法によって、工業上重要なカルボン酸類、アルデヒド類、ケトン類が大量に製造されている。これらの方法では、重クロム酸カリウム、過マンガン酸カリウムのような重金属触媒や過酸化水素、有機過酸化物のような過酸化物、硝酸などの酸類、白金系触媒などが用いられてきた。しかしながらこれら化学的酸化法では、過度の酸化反応の進行や位置選択性、立体選択性の欠如、反応の調節の困難さなどの問題が多く、副反応の進行を制御することも困難である。

【0003】さらに、これら化学的酸化法では、重金属触媒や酸触媒を用いることによる環境汚染の問題、過酸化触媒を用いることによる安全性の問題、白金系触媒を用いることによる触媒コストの問題などの多くの問題点がある。

【0004】一方、そのような化学的酸化法の欠点を克服するために、省エネルギー性、高選択性、安全性などの長所を有する生体触媒を利用するアルコール類の酸化方法も広く試みられている〔太田博道、有合化、41巻、1018（1983）；太田博道、有合化、46巻、726（1989）参照〕。

【0005】しかしながら、酸化酵素を用いるアルコール類の酸化法は、高価な触媒の問題や補酵素要求性の問題などから、高コスト化を免れない。また、微生物を用いるアルコール類の酸化法の場合には、アルコール類や酸化生成物のカルボン酸類、ケトン類などの毒性による微生物の死滅ないしは酵素活性の低下が避けられず、これまでに工業化された例は、製造困難な光学活性体の生産や位置異性体の製造など、ごく一部の高価な物質の製造に限られてきた。

【0006】さらに微生物を用いるアルコール類の酸化は、水不溶性ないしは難溶性のアルコール類を酸化する際には、これを水中に強制分散させるために大きい攪拌力と通気が不可欠であり、製造コストが高つくという問題と、原料アルコール類が懸濁状態にあるために反応速度が低いという問題点があった。

【0007】したがって、上記の化学的酸化法の欠点を克服し、なおかつ既存の生物学的酸化法の欠陥を補うよ

2

うな新規なアルコール類の生物学的酸化方法の開発が強く望まれている。

【0008】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者は、微生物を用いるアルコール類の酸化方法において、基質のアルコール類及び酸化生成物のカルボン酸類、ケトン類などの微生物に対する毒性の問題を回避し、水中強制分散や通気等の面倒な操作を必要としないアルコール類の生物学的酸化方法について鋭意検討した結果、栄養源および水を含む親水性固定化担体に微生物を植菌し、これに微生物に対して毒性を発現しない有機溶媒を接触させると、有機溶媒と固定化担体との界面で微生物菌体が旺盛に増殖して担体上に菌体相を形成し、この菌体相が有機溶媒中に添加したアルコール類を高い反応速度と収率で酸化することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】かくして、本発明に従えば、親水性固定化担体に、1級及び／又は2級水酸基の酸化能を有する微生物を付着固定化し、該微生物の栄養源を含む水性媒体の存在下に、アルコール類を含む実質的に水に不溶性ないしは難溶性の有機溶媒を該担体上の固定化菌体相と接触せしめることを特徴とするアルコール類の酸化方法が提供される。

【0010】本発明の1つの特徴は、脂肪族炭化水素に代表される有機溶媒と親水性固定化担体との界面で、微生物の栄養源を含む水性媒体を供給しつつ微生物を増殖させて形成された菌体相を触媒として利用できる点にある。これにより、アルコール類を実質的に水に不溶性もしくは難溶性の有機溶媒に溶解した形で該菌体相に接触させて酸化反応を行なわせることが可能になり、その結果、高い反応速度と触媒の長期安定性が達成され、攪拌動力が事実上不要である等の利点が得られる。また、本発明のもう1つの特徴は、基質であるアルコール類は微生物に体して強い毒性を示すにもかかわらず、これを非常に高い濃度で有機溶媒に添加することができ、菌体相に接触し得る点にある。例えば、n-オクタノールや、n-デカノールでは、エマルジョン系ではわずか0.5%存在するだけで微生物は死滅してしまう。しかしながら、本発明に従えば、例えばシュドモナス・アチダI FO 13696は、有機溶媒中にn-オクタノールを12%、またはn-デカノールを24%含んでいても死滅せず、増殖して菌体相を形成する。このように本発明によれば、微生物菌体相に対して高濃度のアルコール類を接触することが可能であり、その結果、高い反応速度と高い収量が得られ、アルコール類を低コストで酸化することができる。

【0011】本発明のさらにもう1つの特徴は、脂肪族炭化水素のような有機溶媒は、一般に水にくらべて数倍から十数倍の酸素溶解度を有するため、アルコール類の酸化に要する酸素を供給するための通気や攪拌が少なく済むという点にあり、場合によっては通気、攪拌をし

3

なくても高い反応速度と高い収量でアルコール類を酸化することが可能である。

【0012】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0013】なお、上記固定化菌体相に接触させる有機溶媒又は基質であるアルコール類の有機溶媒溶液を、以下、有機液相ということがある。

【0014】本発明で使用可能な固定化担体は、親水性のものであれば特に制約はなく、栄養源を含む水溶液を含浸もしくは接触させて有機溶媒との界面に存在する微生物にこれを供給することができるものであれば、いかなる素材であっても使用可能であり、具体的には例えば、アルギン酸、カラギーナン、デンプンマトリックス、寒天、沱紙のようなセルロース材などの天然高分子；ポリビニルアルコール、ウレタンポリマー、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸などの合成高分子；泡ガラス、シリカゲルなどの無機物などが挙げられる。

【0015】これら固定化用担体の形状には特に制約はなく、繊維状、膜状、粒状等の任意の形状に成形されていることができ、また布、不織布、紙、ボール紙等の形態に成形されたものであってもよい。

【0016】一方、上記固定化菌体相に接触する有機液相における有機溶媒又は基質のアルコール類の有機溶媒溶液調製用の有機溶媒は、付着微生物菌体に対して実質的に毒性を示さないものが好ましく、具体的には、ヘキササン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン等の炭素数6～20のメタン系炭化水素に代表されるノルマルパラフィン類又は流動パラフィン類；イソオクタン等のイソパラフィン類；ペンチルベンゼン、ヘキシルベンゼン、ヘプチルベンゼン、オクチルベンゼン等の脂肪族鎖の炭素数が5～15のノルマルアルキルベンゼン類；キユメン等のイソアルキルベンゼン類；シクロヘキサンの脂環式炭化水素類；ジエチルエーテル等のエーテル類などを例示することができる。

【0017】上記固定化担体に付着させて、担体と有機液体との界面で増殖させて使用する1級及び／又は2級水酸基の酸化能を有する微生物は、細菌類、カビ類、酵母、放線菌類等のいずれの微生物であってもよい。具体的には例えば、グルコンバクター (*Gluconobacter*) 属、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アリスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、ノカルディア (*Nocardia*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属等に属する微生物が挙げられる。さらに具体的には、グルコンバクター・ロゼウス (*Gl. roseus*)、グルコンバクター・オキシダンス (*Gl. oxydans*)、

4

アセトバクター・リクエファシエンス (*Ac. liquefaciens*)、シュードモナス・プチダ (*Ps. putida*)、コリネバクテリウム・エクイ (*Co. equi*)、アリスロバクター・シンプレックス (*Ar. simplex*)、ロドコッカス・ロドニー (*Rh. rhodnii*)、ロドコッカス・エクイ (*Rh. equi*)、ノカルディア・ファルシニカ (*No. farcinica*)、カンジダ・ユーティリス (*Ca. utilis*)、ハンゼヌラ・アノマラ (*Ha. anomala*)、アスペルギス・ニーガー (*As. niger*) 等を挙げることができる。

【0018】かかる微生物の担体への付着固定化は、例えば、菌体分散液をあらかじめ栄養源を含む水性媒体を含ませた担体に塗布または散布するか、担体を菌体培養液中に浸漬するか、微生物菌体を適当な方法で担体に付着させた後、担体に栄養源を含む水性媒体を供給する等の方法で担体上に微生物菌体を付着させた後、その担体はあらかじめ栄養源を含む水性媒体中で培養することもできるが、通常、基質としてのアルコール類を含むかまたは含まない有機溶媒と接触させた状態で培養し、付着した微生物菌体を担体と有機溶媒との界面で増殖させ、担体上に固定化菌体相を形成させることにより行うのが適当である。この培養により、微生物は担体表面に強固に付着し、固定化菌体相が担体から剥離するようなことはほとんどない。

【0019】上記培養において使用し得る微生物の栄養源は、使用菌体の種類に応じて、その菌体に最適のものを選択することができ、例えば、グルコース等の炭素源、尿素等の窒素源、硫酸マグネシウム等の微量金属塩、酵母エキス等の微量栄養源よりなるごく一般的なものでもよい。

【0020】固定化菌体への栄養源を含む水性媒体すなわち培養液の供給は、担体が例えば寒天のように培養液を十分に含有保持しうるものであれば、担体に予め含ませておくことにより行うことができ、及び／又は例えば、上記有機液相に培養液を加え、形成される有機液相と培養液相の界面に微生物固定化担体を介在させることにより行うこともできる。

【0021】培養は一般に、恒温槽、インキュベーター等の培養装置中で行うことができ、あるいは担体を基質を含むか含まない有機溶媒中に浸漬し、場合によってはさらに栄養源を含む水性媒体を加えた反応容器中で温度調節しながら行ってもよい。培養温度、培養時間等の培養条件は使用微生物の種類に応じて、最適の条件を選択することができる。

【0022】増殖あるいは酸化反応に要する酸素は、有機溶媒中に通気すればよいが、一般に有機溶媒は水に比して数倍から十数倍の酸素溶解度を有しているため、かならずしも通気する必要はない。また、培養中の攪拌についても、基質であるアルコール類は有機溶媒中に溶解

5

して存在しているため、エマルジョン法のような強烈な攪拌は不要であり、また、攪拌が不要である場合が多い。

【0023】基質としてのアルコール類は、上記培養の初期から添加してもよく、または微生物が十分に増殖して固定化菌体相を形成した後に添加してもよい。あるいは培養初期から固定化菌体相形成までの任意の時点で加えてもよい。上記のように、アルコール類は微生物に対して毒性を発現する場合が多いため、一般には、菌体相が十分に成長してから添加する方が高い成績が達成される。

【0024】かくして、担体上に固定化菌体相を、基質としてのアルコール類の有機溶媒溶液からなる有機液相との接触状態で培養をつづけることにより、アルコール類の酸化反応を行なわせることができる。

【0025】この固定化微生物によるアルコール酸化反応に基質として供しうるアルコール類には特に制限されず、固定化微生物のアルコール酸化能に応じて各種のものを使用することができる。

【0026】基質として供しうるアルコール類として、1級アルコールとしては、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、イソブタノール、*n*-アミルアルコール、イソアミルアルコール、*n*-オクタノール、*n*-デカノール等の低級アルコール；ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール等の高級アルコール；エチレングリコール、1, 3-プロパンジオール、1, 4-ブタンジオール、1, 6-ヘキサンジオール、トリメチロールプロパン、ペンタエリスリトール等の脂肪族多価アルコール；ベンジルアルコール等の芳香族アルコール等が挙げられる。また、2級アルコールとしては、イソプロパノール、2-ブタノール、2-ペンタノール、2-オクタノール、2, 6-ジメチル-4-ヘプタノール等の脂肪族アルコール；ベンズヒドロール等の芳香族アルコール、シクロヘキサノール等の脂環式アルコール等が挙げられる。

【0027】有機溶媒中のアルコール類の濃度は特に制限されるものではなく、菌体に対する毒性に応じて決めることができる。特に酸化反応に供するアルコール類が実質的に水不溶性ないし難溶性の場合には、これらが水相すなわち親水性固定化担体側へ移行しないため、その菌体に対する毒性を大幅に減じることができる。例えば、*n*-オクタノールの場合、シュードモナス・プチダ (*Ps. putida*) やシュードモナス・フラジ (*Ps. fragi*) などのシュードモナス属細菌では有機液相中の濃度12%でも増殖可能であり、また、アリスロバクター・デュオデカディス (*Ar. duodecadis*) などのアリスロバクター属細菌、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) などのバチルス属細菌、アセトバクター・アセチー (*A*

6

*c. acetii*) やグルコノバクター・オキシダンス (*Gl. oxydans*) などの酢酸菌では有機液相中の濃度3%でも増殖可能である。さらに毒性の弱い*n*-デカノールの場合には、多くの細菌で24%以上、多くの酵母で6%以上の濃度に耐える。

【0028】一方、酸化反応に供するアルコール類が水溶性であって、水中で微生物に対して強い毒性を示すものであっても、本発明の方法によれば、その毒性を緩和できる場合がある。たとえば、*n*-ブタノールは水に対して約7%の溶解度を有し、水中ではわずか0.2%の低濃度で微生物に対して毒性を示すが、この*n*-ブタノールの*n*-パラフィン溶液を本発明の方法に従って、バチルス (*Bacillus*) 属細菌やアリスロバクター (*Arthrobacter*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、マイクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属等の細菌、あるいはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属等の酵母に接触させた場合、ブタノール濃度が3%以上でも増殖が可能である。

【0029】以上述べた本発明の方法によれば、脂肪族、芳香族、脂環式等の1級及び/又は2級アルコール類の酸化反応を固定化微生物の増殖菌体を用いて極めて効率的に行なうことができる。その際、副反応が生ずる可能性がある場合には、適当な代謝又は変換阻害剤の添加によってそれを遮断するか又はそのような副反応が生じないように育種改良した代謝欠損株を用いることができる。

【0030】本発明の方法によれば、酸化反応に要する酸素はほとんど有機液相側から供給され、生産物のアルコール酸化物 (アルデヒド類、ケトン類、カルボン酸類) は有機液相に蓄積される。従って、有機液相に蓄積される生産物を回収し、基質のアルコール類を補充する等の方法を行なうことにより、固定化菌体相と基質との接触頻度を飛躍的に増加せしめることができ、反応速度と収率、収量を大幅に向上させることが可能となり、連続操業も可能となる。

【0031】かくして、本発明の方法を、例えば工業薬品、医薬品、化粧品、香料、洗剤、界面活性剤、繊維処理剤、油脂、染料、塗料印刷材料等の分野における工業上重要な各種アルデヒド類、ケトン類、カルボン酸類の製造工程に適用することにより、生産コストの低下、工程の省エネルギー化、省力化等、工業的に有利な種々の利点を得ることができる。

【0032】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、部及び%は重量基準である。

【0033】実施例1

ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.2%、硫酸マグネシウム0.1%、寒天1.5%よりなる寒天平板をガラス

7  
シャーレ（表面積 38.5 cm<sup>2</sup>）に調製し、表1にある各種微生物の懸濁液200μlをコンラージ棒を用いて塗抹した。乾燥後、30℃で2日培養して菌体相を形成させた後、10%2-オクタノールのn-ヘキサデカン溶液を10ml重層し、30℃で7日間静置培養し \*

表

8  
\*た。培養後、溶媒相1μlをガスクロマトグラフィーによって分析し、生成した2-オクタノン濃度を測定した。その結果を表1に示す。

【0034】

【表1】

1

供 試 微 生 物	2-オクタノン 生成濃度(g/l)
ノカルディア・イタリカ JCM 03163	9.9
ノカルディア・ファルシニカ JCM 3002	10.7
ロドコッカス・エリトロポリス JCM 3201	6.3
ロドコッカス・ロードニー JCM 3203	8.1
ロドコッカス・エクイ JCM 6817	10.6
ロドコッカス・エクイ JCM 3730	20.7
アリスロバクター・シンプレックス JCM 1363	5.1
グルコノバクター・スポキシダンス IFO 3172	2.6
グルコノバクター・オキシダンス IFO 3189	2.1
グルコノバクター・グルコニクス IFO 3171	0.7
アセトバクター・リクエファシエンス IFO 12258	3.7
グルコノバクター・アセティ・ サブスペーシース・アセチイ IFO 3281	1.7
アセトバクター・バステリアヌス・ サブスペーシース・エスツネンシス IFO 13751	2.8
シュードモナス・プチダ IFO 13696	5.5

## 【0035】実施例2

実施例1と同様の培地100mlを内容量480mlの密栓可能なガラス容器に注いで寒天平板を調製した（表面積43cm<sup>2</sup>）。これに表2に示す各種微生物懸濁液100μlをコンラージ棒を用いて塗抹し、30℃で2日間培養した。その後、10%2-オクタノールのカプリル酸エチル溶液10mlを重層し、30℃で120r※40

※pmの往復振盪下2日間培養した。培養後、培養相1μlをガスクロマトグラフィーによって分析し、生成した2-オクタノン濃度を測定した。その結果を表2に示す。

【0036】

【表2】



表 2

供 試 微 生 物	2-オクタノン 生成濃度(g/l)
グルコノバクター・オキシダンス IFO 3189	3.9
グルコノバクター・サボキシダンス IFO 3172	2.6
アセトバクター・アセチイ・ サブスペーシース・アセチイ IFO 3281	2.9
アセトバクター・ハクエファシエンシス IFO 12258	3.9
アセトバクター・アセトサス IFO 3129	3.7
アセトバクター・パステリアヌス・ サブスペーシース・エスツネンシス IFO 13751	2.8
ロドコッカス・エクイ IFO 3730	20.4

## 【0037】実施例3

実施例2と同様にして調製した寒天平板（表面積43cm<sup>2</sup>）にロドコッカス・エクイ IFO 3730の懸濁液100μlを塗布し、30℃で2日間培養した。これに2%2-メチルシクロヘキサノールのn-ヘキサデカン溶液を10ml重層し、100rpmの往復振盪下で4日間培養した。培養後、培養相1μlをガスクロマトグラフィーで分析し、生成2-メチルシクロヘキサノン濃度を測定した。その結果、9.8g/lの2-メチルシクロヘキサノンの蓄積を確認した。

## 【0038】実施例4

グルコノバクター・オキシダンス IFO 3189の1日培養液200ml中にアルギン酸カルシウムビーズ10gを投入し、5分間静置してビーズ表面に微生物菌体を付着させた。その後ビーズを培養液から引き上げ、余分な水分を除いた後、ノルマルパラフィン150mlの入ったガラス内容量500mlのガラス容器に投入し、1日培養してビーズ表面に固定化菌体相を形成させた。次いでn-デカノールを10%となるように、また、β-酸化系遮断剤であるアクリル酸を0.005%添加し、0.2vvmの通気、20rpmの攪拌下で5日培養した。なお、ビーズは強固に凝集し、溶媒相に分散しなかった。培養後、培養相1μlをガスクロマトグラフィーで分析し、生成n-デカン酸濃度を測定した。その結果、9.5g/lのn-デカン酸の蓄積を確認した。

## 【0039】実施例5

表面積1600cm<sup>2</sup>（20×40cm<sup>2</sup>）のヒタ折り汚紙の折線を縦にして反応槽に入れ、カンジダ・ユーティリス IFO 0396の1日培養液200mlを注ぎ込み、5分間放置して菌体を汚紙に付着させた。次に培養\*

\*液を除き、菌体を含まない培地20mlを反応槽底部に入れ、溶媒相であるn-パラフィン層に2-エチル-1,3-ヘキサジオールを10%レベルで添加した。培養は30℃200rpmの攪拌、0.2vvmの通気下で7日間行った。培養後溶媒相1μlをガスクロマトグラフィーで分析し、生成した2-エチル-3-ヒドロキシヘキサン酸を定量した。その結果、溶媒相側には6.7g/lの2-エチル-3-ヒドロキシヘキサン酸が蓄積していた。

## 【0040】比較例1

ロドコッカス・エクイ IFO 3730の1日培養液2mlをポリペプトン1%、酵母エキス0.2%、硫酸マグネシウム0.1%、Span-80 0.01%よりなる培地20mlに植菌し、30℃で1日培養後、2-オクタノール82、164、246、328mgを添加して3日間120rpmで振盪培養した。培養後、ジエチルエーテルで3回抽出し、乾燥、希釈後、ガスクロマトグラフィーで生成2-オクタノン濃度を測定した。その結果、いずれも0.1g/l以下の2-オクタノンしか蓄積していなかった。

## 【0041】比較例2

ロドコッカス・エクイ IFO 3730の1日培養液2mlを比較例1と同様の培地20mlに植菌し、30℃で1日培養した。その後、2-メチルシクロヘキサノール94、187、281、374mgを添加し、30℃、120rpmの往復振盪下3日間培養した。培養後、ジエチルエーテルで3回抽出し、乾燥、希釈後、ガスクロマトグラフィーで生成2-メチルシクロヘキサノン濃度を測定した。その結果、いずれも0.1g/lの2-メチルシクロヘキサノンしか蓄積していないことが確認された。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 1 2 R 1:365)				
(C 1 2 P 7/26				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 P 7/26				
C 1 2 R 1:06)				
(C 1 2 P 7/26				
C 1 2 R 1:40)				
(C 1 2 P 7/40				
C 1 2 R 1:365)				
(C 1 2 P 7/40				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 P 7/40				
C 1 2 R 1:06)				
(C 1 2 P 7/40				
C 1 2 R 1:40)				